

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/090394 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/21**,
C12P 13/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002689

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. März 2005 (14.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 013 847.8 20. März 2004 (20.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **DEGUSSA AG** [DE/DE]; Bennigsenplatz 1, 40474
Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OSSWALD, Stef-**
fen [DE/DE]; Landwehrstrasse 33, 63517 Rodenbach
(DE). **WECKBECKER, Christoph** [DE/DE]; Au-
gust-Imhof-Strasse 25, 63584 Gründau (DE). **HUTH-**
MACHER, Klaus [DE/DE]; Lärchenweg 18, 63571
Gelnhausen (DE). **GERASIMOVA, Tatijana** [RU/RU];

Podolskij Kursantov, 18/1, fl. 626, Moscow, 117545 (RU).
NOVIKOV, Andrey [RU/RU]; Kransnopresnenskaya nab.,
1/2, fl. 107, Moscow, 123610 (RU). **RYABCHENKO,**
Ludmila [RU/RU]; Moscow region, Mozajskoe sh.,
113, Odintcovo, 14311 (RU). **YANENKO, Alexander**
[RU/RU]; Kutuzovsky pr., 33, fl. 135, Moscow, 12193
(RU). **EGOROVA, Ksenia** [RU/DE]; Beerentalweg 119,
21077 Hamburg (DE).

(74) **Gemeinsamer Vertreter: DEGUSSA AG**; Intellectual
Property Management, PATENTE und MARKEN, Stan-
dort Hanau, Postfach 13 45, 63403 Hanau (DE).

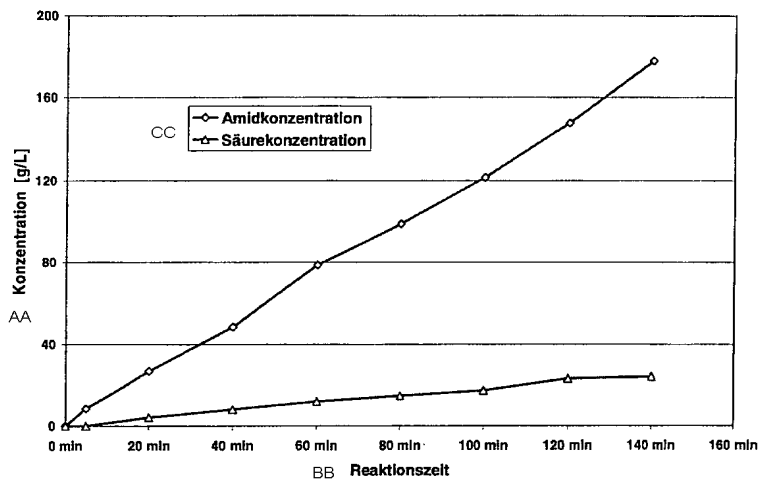
(81) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart):** AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):** ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CYANIDE TOLERANT NITRILHYDRATASES

(54) Bezeichnung: CYANIDTOLERANTE NITRILHYDRATASEN



AA...CONCENTRATION
BB...REACTION TIME
CC...AMIDE CONCENTRATION
ACID CONCENTRATION

(57) **Abstract:** The invention relates to cyanide tolerant nitrilhydratases produced from *Pseudomonas* genus microorganisms which exhibit a high cyanide tolerance. Said invention also relates to the use of said compounds for producing amides from nitriles in the presence of cyanides, polynucleotide sequences coding for said enzymes and said enzymes.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratase aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, die eine erhöhte Cyanidtoleranz aufweisen, ihre Verwendung zur Herstellung von Amid aus Nitril in Gegenwart von Cyaniden und für diese Enzyme kodierende Polynukleotidsequenzen und diese Enzyme.

WO 2005/090394 A3



GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:

22. Dezember 2005

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/21 C12P13/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 789 211 A (YAMADA ET AL) 4 August 1998 (1998-08-04) the whole document -----	1-28
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 27 August 1998 (1998-08-27) the whole document -----	1-28
X	EP 1 266 962 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 18 December 2002 (2002-12-18) the whole document -----	1-28
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>° Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">28 June 2005</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">13. 10. 2005</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Novak-Giese, S</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/002689

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRADY D ET AL: "Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. MAR 2004, vol. 64, no. 1, March 2004 (2004-03), pages 76-85, XP002333496 ISSN: 0175-7598 the whole document -----	1-28
Y	NOJIRI M ET AL: "Functional expression of nitrile hydratase in Escherichia coli: requirement of a nitrile hydratase activator and post-translational modification of a ligand cysteine." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY. APR 1999, vol. 125, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 696-704, XP002333497 ISSN: 0021-924X the whole document -----	1-28
P,X	WO 2004/067738 A (DEGUSSA AG; SYLDATK, CHRISTOPH; BRANDAO, PEDRO; BULL, ALAN, T; VERSECK) 12 August 2004 (2004-08-12) the whole document -----	1-28
P,X	WO 2004/111227 A (DEGUSSA AG; MAY, OLIVER; DRAUZ, KARLHEINZ; BUCHHOLZ, STEFAN) 23 December 2004 (2004-12-23) the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/002689

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-28 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 1, 2 and 3, and methods of using them.

2. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 6, 7 and 8, and methods of using them.

3. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 4 and 5, and methods of using them.

4. Claims 1-28 (in part)

polypeptides or polynucleotides that are coded by Seq. Id. No. 9 and 10, and methods of using them.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002689

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5789211	A	04-08-1998	NONE	
WO 9837204	A	27-08-1998	AU 6331998 A CA 2281001 A1 EP 0972049 A1 US 6303352 B1 US 6087140 A	09-09-1998 27-08-1998 19-01-2000 16-10-2001 11-07-2000
EP 1266962	A	18-12-2002	JP 2002369697 A US 2003124691 A1	24-12-2002 03-07-2003
WO 2004067738	A	12-08-2004	NONE	
WO 2004111227	A	23-12-2004	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002689

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/21 C12P13/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 789 211 A (YAMADA ET AL) 4. August 1998 (1998-08-04) das ganze Dokument	1-28
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 27. August 1998 (1998-08-27) das ganze Dokument	1-28
X	EP 1 266 962 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 18. Dezember 2002 (2002-12-18) das ganze Dokument	1-28
	----- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13. 10. 2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Novak-Giese, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BRADY D ET AL: "Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. MAR 2004, Bd. 64, Nr. 1, März 2004 (2004-03), Seiten 76-85, XP002333496 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument	1-28
Y	NOJIRI M ET AL: "Functional expression of nitrile hydratase in Escherichia coli: requirement of a nitrile hydratase activator and post-translational modification of a ligand cysteine." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY. APR 1999, Bd. 125, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 696-704, XP002333497 ISSN: 0021-924X das ganze Dokument	1-28
P,X	WO 2004/067738 A (DEGUSSA AG; SYLDATK, CHRISTOPH; BRANDAO, PEDRO; BULL, ALAN, T; VERSECK) 12. August 2004 (2004-08-12) das ganze Dokument	1-28
P,X	WO 2004/111227 A (DEGUSSA AG; MAY, OLIVER; DRAUZ, KARLHEINZ; BUCHHOLZ, STEFAN) 23. Dezember 2004 (2004-12-23) das ganze Dokument	1-28

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-28 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 1,2 und 3 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

2. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 6,7 und 8 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

3. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 4 und 5 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

4. Ansprüche: 1-28 (teilweise)

Polypeptide bzw. Polynukleotide die von SEQ ID Nos 9 und 10 kodiert werden, bzw. Verfahren diese zu benutzen.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002689

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5789211	A	04-08-1998	KEINE	

WO 9837204	A	27-08-1998	AU 6331998 A	09-09-1998
			CA 2281001 A1	27-08-1998
			EP 0972049 A1	19-01-2000
			US 6303352 B1	16-10-2001
			US 6087140 A	11-07-2000

EP 1266962	A	18-12-2002	JP 2002369697 A	24-12-2002
			US 2003124691 A1	03-07-2003

WO 2004067738	A	12-08-2004	KEINE	

WO 2004111227	A	23-12-2004	KEINE	
